

ICS 01.040.03

A 01

CSPSTC

团 体 标 准

T/CSPSTC X-2018

食品中常规致病菌快速检测
(恒温扩增芯片法)

Rapid determination of pathogenic bacteria in food

- Biochip method

(征求意见稿)

2018-xx-xx 发布

2018-xx-xx 实施

中国科技产业促进会 发布

目 次

前 言.....	II
1 范围.....	3
2 术语与定义.....	3
3 设备和材料.....	3
4 培养基和试剂.....	4
5 检测程序.....	4
6 操作步骤.....	5
7 结果判读.....	6
附 录 A（规范性附录）培养基及试剂.....	7
A.1 食源性共增菌培养基.....	7
A.2 生理盐水.....	7

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则进行起草。

本标准由北京博奥晶典生物技术有限公司和标准联合咨询中心提出。

本标准由中国科技产业化促进会归口。

本标准起草单位：北京博奥晶典生物技术有限公司、博奥生物集团、浙江华腾牧业有限公司、厦门银祥集团有限公司、蜀海（北京）食品有限公司、河北出入境检验检疫局燕郊办事处、秦皇岛出入境检验检疫局检验检疫技术中心、杜邦营养食品配料（北京）有限公司、内蒙古富源国际实业有限公司、蒙牛乳业(北京)有限责任公司、北京市产品质量监督检验院、创新联盟认证中心、广州金鲜食品有限公司、标准联合咨询中心、河北福成食品股份有限公司、西亚斯（大厂）食品有限公司、廊坊欧爵士食品有限公司。

本标准主要起草人：许俊泉、薛洪萍、张岩、沈建平、张志刚、孟凡伟、胥慧、石贞、董艳芳、冯冠、李波、丁圣、张学、钱云开、蒋世卫、卢成绪、宋德强、周艳、谭元芳、王晓阳、郭士军、王耿、景炬辉。

食品中常规致病菌快速检测（恒温扩增芯片法）

1 范围

本标准规定了食品中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠埃希氏菌0157:H7、阪崎肠杆菌、副溶血性弧菌、志贺氏菌和侵袭性大肠埃希氏菌的快速检测方法。

本标准适用于食品中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠埃希氏菌0157:H7、阪崎肠杆菌、副溶血性弧菌、志贺氏菌和侵袭性大肠埃希氏菌的快速检测。

2 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

微流控芯片 microfluidic chip

利用微加工技术，在硅、石英玻璃或高分子材料等基质上加工出各种微细结构，如管道、反应池、微泵、微阀等功能单元，进行样品的处理和分子的微系统。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 3.1 冰箱：2℃~5℃、-20℃±5℃。
- 3.2 恒温培养箱：36℃±1℃。
- 3.3 均质器。
- 3.4 漩涡振荡仪。
- 3.5 电子天平：感量 0.1g。
- 3.6 水浴锅：能升温至 95℃。
- 3.7 高速离心机：12000rpm/分钟。
- 3.8 瞬时离心机。
- 3.9 生物安全柜。
- 3.10 微型分光光度计。
- 3.11 恒温扩增仪。
- 3.12 微流控芯片。
- 3.13 低速离心机。
- 3.14 微量移液器。
- 3.15 无菌离心管：1.5ml、200ul。
- 3.16 无菌吸管：50ml。
- 3.17 锥形瓶：容量 1000ml、500ml。
- 3.18 量筒：容量 500ml。
- 3.19 擦镜纸。

4 培养基和试剂

- 4.1 食源性致病菌加强型培养基：配置方法见附录 A 中 A.1。
 4.2 适用型核酸提取试剂盒。
 4.3 生理盐水：配置方法见附录 A 中 A.2。
 4.4 适用型核酸检测试剂盒（生物芯片法）：碟式芯片结构示意图，见图 1。

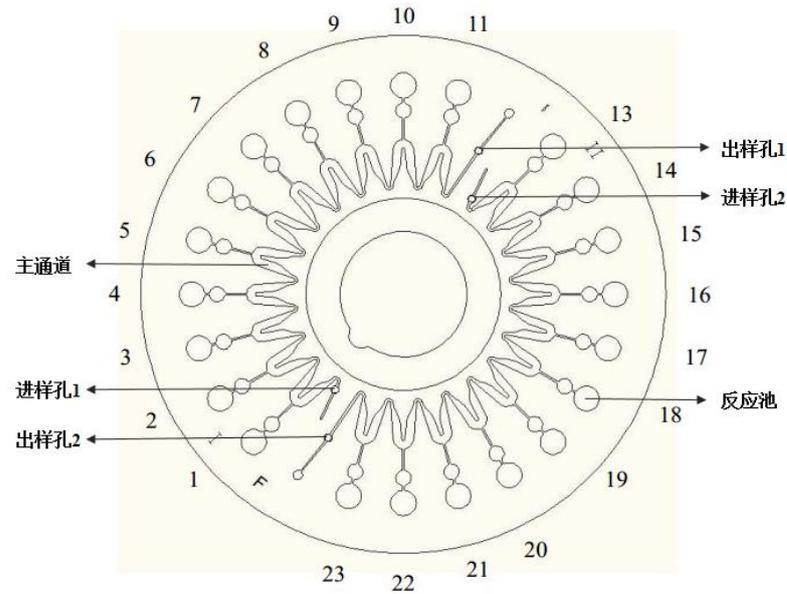
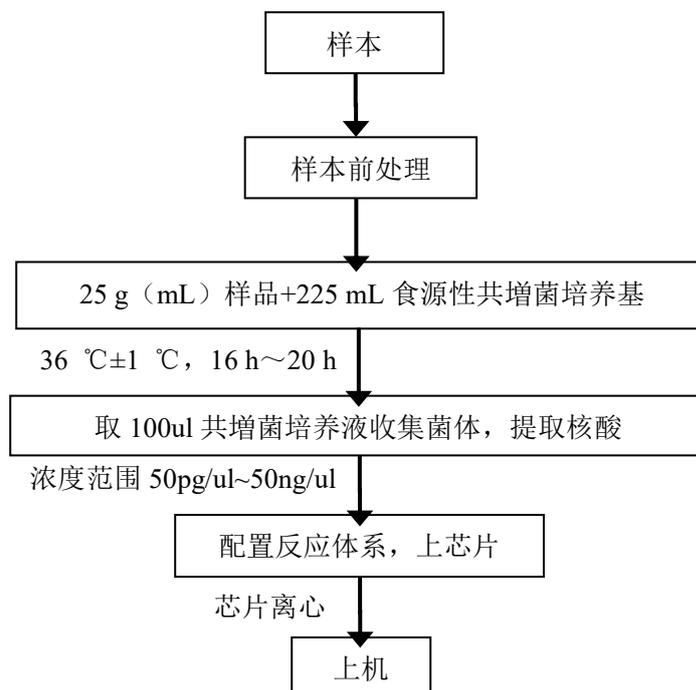


图 1 碟式芯片结构示意图

5 检测程序

食品中常规致病菌的快速检测程序，见图2。



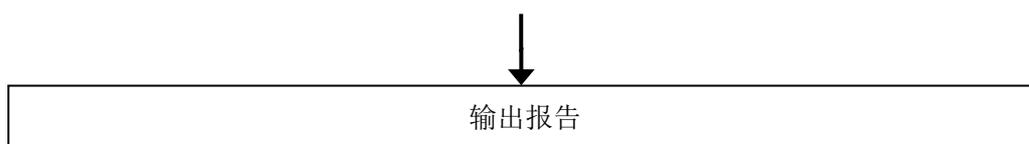


图2 食品中常规致病菌的快速检测程序

6 操作步骤

6.1 增菌

称取25 g(mL)样品放入盛有225mL食源性增强型培养基的无菌均质杯中,以8 000 r/min~10 000 r/min均质1 min~2 min,或置于盛有225mL食源性增强型培养基的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打1 min~2 min。若样品为液态,不需要均质,振荡混匀。无菌操作将样品转至500mL锥形瓶中,如使用均质袋,可直接进行培养,于36 ℃±1 ℃培养16 ~20 小时。

如为冷冻产品,应在45 ℃以下不超过15 分钟,或2 ℃~5 ℃不超过18 h解冻。

6.2 样本处理

吸取食源性增强型培养液100ul, 12000 r/min, 离心2 min, 完全吸弃上清, 加入700ul生理盐水, 震荡混匀, 12000 r/min, 离心2 min, 弃上清, 获得的菌体即可进行后续的基因组DNA提取。

6.3 基因组 DNA 提取

6.3.1 向所收集菌体中加入50~100ul核酸提取试剂, 充分震荡混匀, 使沉淀完全悬浮;

6.3.2 将悬浮液转移至核酸提取管中, 旋紧管盖, 使用漩涡振荡仪剧烈震荡5 min;

6.3.3 使用水浴锅, 95 ℃加热5 min;

6.3.4 高速离心机, 12000 r/min, 离心5 min, 将上清液转移至洁净离心管中, -20 ℃保存备用;

6.3.5 利用微型分光光度计进行核算浓度测定: 50pg/ul-50ng/ul;

6.4 扩增反应

6.4.1 配置恒温扩增反应体系

将提取的基因组DNA与恒温扩增反应试剂混合进行扩增, 见表2。

表1 恒温扩增反应体系

反应物	体积 (ul)
恒温扩增试剂	13
模板 DNA	13
共计	26

6.4.2 芯片加样

使碟式芯片恢复至室温, 吸取25ul配置好的核酸扩增反应体系, 从 I 区进样口加入到芯片主通道中, 待其充满芯片主通道即可停止加样。用擦镜吸纸轻轻擦掉多余的液体; II 区操作同 I 区, 取1张封口膜, 覆盖于进出样口上, 再取一支洁净吸头, 向一个方向按压封口膜至贴合紧密。

6.4.3 芯片离心

将加样后的芯片固定在低速离心机上, 以6 000 r/min离心30 s后取下, 如果芯片“V”型通道中仍有气泡, 可适当延长离心时间, 直至气泡消失。

6.5 恒温扩增

将离心后的芯片固定在恒温扩增微流控核酸分析仪上，根据软件提示步骤进行操作，按照表3的核酸扩增反应程序进行检测。

表 2 核酸扩增反应程序

步骤	1	2
温度 (°C)	37	65
时间 (分钟)	3	47

7 结果判读

检测完成后软件将自动进行数据处理和分析，自动生成检测报告。

7.1 结果判读标准

- 信号值 > 背景信号平均值，且 T_p 值 $\leq T_p$ 阈值，且扩增倍数 \geq 扩增倍数阈值，该种情况下判定为阳性；
- 信号值 > 背景信号平均值，且 T_p 值 $> T_p$ 阈值，且扩增倍数 $<$ 扩增倍数阈值，该种情况下判定为阴性；
- 信号值 $<$ 背景信号平均值，该种情况下判定为异常。

注： T_p 值 (Time Positive)：扩增曲线开始起峰的位置 (扩增开始位置)；

扩增倍数：扩增曲线最高点与基线区平均值的比值。

7.2 质量控制

每测试芯片内均设有1个阳性质控和3个阴性质控。根据结果判读标准，阳性质控检测结果应为阳性，同时3个阴性质控结果均为阴性。若任一结果错误，则判定本次样本检测结果无效，需要进行复检。

附 录 A
(规范性附录)
培养基及试剂

A.1 食源性共增菌培养基

A.1.1 制法

A.1.1.1 方法一

取本品1包，撕开包装袋，将培养基粉末倒入2000ml三角瓶中，加入蒸馏水或去离子水900ml，搅拌至完全溶解，定量到1500ml，从中分别量取500ml于2个2000ml三角瓶中。分别向上述3个三角瓶添加400ml蒸馏水或去离子水，混合均匀。121℃高压蒸汽灭菌15 min，冷却至室温即可使用或4℃保存待用（有效期1个月）。

A.1.1.2 方法二

取本品1包，撕开包装袋，将培养基粉末倒入1000ml三角瓶中，加入蒸馏水或去离子水180ml，搅拌至完全溶解，定容到450ml，获得母液。母液121℃高压蒸汽灭菌15 min，冷却至室温即可使用或4℃储存，并在1个月内使用完。每次使用时，量取37.5ml母液于500ml三角瓶，添加187.5ml灭菌的蒸馏水或去离子水，混合均匀，即可使用。

A.2 生理盐水

A.2.1 成分

氯化钠	0.9g
蒸馏水	100ml

A.2.2 制法

将氯化钠加入蒸馏水中，搅混均匀，121℃高压灭菌15 min。
